

METHOD FOR DIFFERENTIATION OF IMMATURE HEPATOCYTE TO MATURE HEPATOCYTE

Patent number: JP2000287680
Publication date: 2000-10-17
Inventor: MIYAJIMA ATSUSHI; KINOSHITA TAISEI
Applicant: SENTAN KAGAKU GUUTSU INCUBATI
Classification:
- **international:** C12N5/06; C12N5/10; C12N15/09; C12Q1/02
- **european:**
Application number: JP19990103364 19990409
Priority number(s): JP19990103364 19990409

Report a data error here

Abstract of JP2000287680

PROBLEM TO BE SOLVED: To differentiate immature hepatocytes to mature hepatocytes through a method for screening a compound controlling the differentiation of an immature hepatocyte or the like, which comprises culturing the immature hepatocyte in the presence of oncostatin M and dexamethasone. **SOLUTION:** Immature hepatocytes are differentiated to mature hepatocytes as follows: an embryo hepatic tissue of a mouse or the like is finely minced; the minced tissue is dispersed in a dispersing buffer containing an enzyme; subsequently blood cells are removed by the hemolysis with a hypotonic buffer solution; the obtained matter is suspended in a medium; it is plated on a tissue culture dish coated with gelatin; after several hours, hematopoietic cells and cell fragments are removed by washing with the medium to obtain immature hepatocytes; subsequently, the immature hepatocytes are culture in the presence of oncostatin M and dexamethasone; and the differentiation of the immature hepatocytes to mature hepatocytes is detected by using cell cluster formation, intracellular glycogen accumulation, intracellular albumin production, TAT gene expression, G6P-ase gene expression, ammonia detoxification or the like as an index.

Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-287680
(P2000-287680A)

(43) 公開日 平成12年10月17日 (2000. 10. 17)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N	5/06	C 1 2 N 5/00	E 4 B 0 2 4
	5/10	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
	15/09	C 1 2 N 5/00	B 4 B 0 6 5
C 1 2 Q	1/02	15/00	A

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号	特願平11-103364	(71) 出願人	899000024 株式会社 先端科学技術インキュベーションセンター 東京都千代田区丸の内一丁目5番1号 新丸の内ビルディング6階
(22) 出願日	平成11年4月9日 (1999. 4. 9)	(72) 発明者	宮島 篤 東京都練馬区立野町31-33
		(72) 発明者	木下 大成 東京都文京区根津2-6-9-302
		(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法

(57) 【要約】

【課題】 未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法を提供する。また、該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【解決手段】 E14胚由来マウス胎児未成熟肝細胞の培養系を確立した。本培養系により増殖した未成熟肝細胞にオンコスタチンMおよびデキサメタゾンを追加すると、成熟肝細胞への分化が誘導されることを見いだした。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 オンコスタチンMおよびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養することを特徴とする、未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法。

【請求項2】 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎児由来である、請求項1記載の方法。

【請求項3】 請求項1または2に記載の方法により調製される成熟肝細胞。

【請求項4】 外来遺伝子が挿入されている、請求項3に記載の成熟肝細胞。

【請求項5】 未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を抑制または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被検試料、オンコスタチンM、およびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(b)該未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を検出する工程、および(c)被検試料非存在下で該分化を検出した場合(対照)と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項6】 未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を、細胞のクラスターの形成、細胞内におけるグリコーゲンの蓄積、細胞内におけるアルブミンの産生、TAT遺伝子の発現、G6Pアーゼ遺伝子の発現、アンモニアの解毒からなる群より選択される指標により検出する、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎児由来である、請求項5または6記載の方法。

【請求項8】 請求項5から7のいずれかに記載の方法により単離しうる、未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を抑制または促進する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、サイトカインを利用して未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法、および該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物のスクリーニング方法に関する。

【0002】

【従来の技術】胎児肝臓は、胚発生時における造血の主要な場となっており、出生期にさまざまな代謝機能が加わっていく。肝臓の発生は、生物学的な解析により、いくつかの明確な段階に分けられることが明らかにされている。

【0003】肝臓の発生は、細胞間相互作用やマトリックス・細胞間相互作用の影響だけでなく、ホルモン様因子による影響も受ける。マウスの場合、肝臓の発生は胎生9日(E9)に始まり、心臓性中胚葉との相互作用によって、中腸性内胚葉が肝臓に分化する。その後、この肝臓原基は、近接する心臓間葉からの誘導シグナルを受け取って横中隔に浸入し、肝細胞索と肝芽になる(Douarin, N.M. (1975) *Med. Biol.*, 53, 427-455; Houssaint, E. (1980) *Cell Differ.*, 9, 269-279)。これらの分化過

程に従い、胎児肝細胞は自律増殖、細胞腫脹、機能成熟を伴う一連の成熟段階を進んでいく。

【0004】肝成熟の度合いは、肝臓特異的に発現する遺伝子や成熟段階特異的に発現する遺伝子を用いて解析されている(Derman, E., et al. (1981) *Cell*, 23, 731-739; Panduro, A., et al. (1987) *Genes Dev.*, 1, 1172-1182)。アルファフェトプロテイン(AFP)は初期段階にある胎児肝のマーカーであり、肝臓の分化が進むに従って、その発現量は減少する(Shiojiri, N., et al. (1991) *Cancer Res.*, 51, 2611-2620)。一方、肝細胞で生合成され、最も含有量の多い蛋白質であるアルブミンの発現は、初期胎児肝細胞(E12)で始まり、成体肝細胞で最大レベルに達する(Tilghman, S.M., et al. (1982) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 79, 5254-5257)。妊娠後期や周産期の段階になると、肝細胞はグルコース-6-ホスファターゼ(G6Pase)やチロシニアミノトランスフェラーゼ(TAT)など数多くの代謝酵素を生産し始め、肝臓の生理的役割の変化に対応する(Greengard, O. (1970) In Litwack, G. (ed.), *Biochemical Actions of Hormones*. Academic Press Inc., New York, USA, pp. 53-87; Haber, B.A., et al. (1995) *J. Clin. Invest.*, 95, 832-841)。そして最終的に出生から数日後に、セリンデヒドラターゼ(SDH)とトリプトファンオキシゲナーゼ(TO)が肝細胞中に誘導される(Nagao, M., et al. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 867, 179-186; Noda, C., et al. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 168, 335-342; Noda, C., et al. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, 1217, 163-173)。悪性肝細胞癌ではこれらの代謝酵素の発現が見られないことがあり、このような腫瘍細胞ではAFPの発現が逆に復活している(Abelev, G.I. (1971) *Adv. Cancer Res.*, 14, 295-358)。このように、AFPや代謝酵素は、肝臓の発生をモニターする際の有用なマーカーであると同時に、細胞の悪性度の指標としても利用できる。

【0005】肝細胞の増殖や分化は、ホルモンやサイトカインなどの細胞外シグナルによる影響を受ける。例えば、グルコルチコイドは、in vivoおよびin vitroどちらでも、成体肝細胞の増殖と機能を調節する。胎児の肝臓において、合成グルコルチコイドであるデキサメタゾン(デキサメタゾン)は、生理的濃度でAFP産生とDNA合成を抑制し、アルブミン産生を上昇させる(Belanger, L., et al. (1981) *Biochemistry*, 20, 6665-6672; Nawa, K., et al. (1986) *J. Biol. Chem.*, 261, 16883-16888; de Juan, C., et al. (1992) *Exp. Cell Res.*, 202, 495-500)。トランスフォーミング増殖因子-β(TGF-β)は、強力な肝細胞増殖阻害剤であり(Nakamura, T., et al. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 133, 1042-1050; de Juan, C., et al. (1992) *Exp. Cell Res.*, 202, 495-500)、出生前の肝細胞のアルブミン産生を増大させることが知られており、これはTGF-βが肝分

化の制御に関わることを意味している (Sanchez, A., et al. (1995) *J. Cell Physiol.*, 165, 398-405)。興味深いことに、TATの mRNA発現制御は、肝臓の発生段階に依存している。TATの mRNAは、初期段階の胎児肝臓には事実上見られないが、後期胚由来の初代肝細胞ではデキサメタゾンにより誘導される。しかし、より早い段階 (妊娠中期; E12-14) の肝細胞では、デキサメタゾンに対する応答としてアルブミンを産生するにもかかわらず、デキサメタゾンによるTATレベルの制御は見られない (Shelly, L.L., et al. (1989) *J. Cell Biol.*, 109, 3403-3410)。これらの結果は、妊娠中期と妊娠後期/周産期との間に、鍵となる成熟段階があることを示唆している。

【0006】このような知見はあるものの、肝臓の発生過程に付随する分子の挙動については、まだ研究が始まったばかりであり、特に分子レベルや生化学レベルではほとんど解明されていないのが現状である。肝細胞の増殖・分化にかかわる因子を同定するためには、未成熟肝細胞から肝細胞への分化を誘導する系の確立が重要なステップとなる。

【0007】また、このような系の確立により、肝細胞を多量に生産することが可能となれば、人工肝臓の開発への道が開かれる。人工肝臓は、肝不全、肝臓癌、肝硬変等肝機能の低下を伴う患者の治療にとって重要であり、殊に、生体肝細胞を用いた正常肝細胞 (癌細胞ではない) からなる人工肝臓を作製することが可能となれば、その恩恵を受ける患者は多く、社会的にも産業的にもきわめて価値の高いものとなる。

【0008】このように、肝臓の発生のメカニズムの解明という研究上の目的のみならず、肝関連疾患の治療など産業上の目的を達成するためにも、肝機能を最終的に保持する肝細胞を多量に生産する系の確立が望まれている。

【0009】ところで、オンコスタチンM (OSM) は、IL-6、IL-11、白血病抑制因子 (LIF)、毛様体神経栄養因子、カルジオトロフィン-1を含むインターロイキン-6 (IL-6) 関連サイトカインファミリーに属する (Bazan, J.F. (1991) *Neuron*, 7, 197-208; Rose, T.M., et al. (1991) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 88, 8641-8645; Pennica, D., et al. (1995) *J. Biol. Chem.*, 270, 10915-10922)。これらのサイトカインは、その受容体がいずれもgp130をシグナルトランスデューサーとしているため、類似の機能を示すことが多い (Taga, T., et al. (1997) *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 797-819)。特に、ヒトオンコスタチンM (hOSM) (Malik, N., et al. (1989) *Mol. Cell. Biol.*, 9, 2847-2853) は、M1単球の分化誘導作用 (Rose, T.M., et al. (1991) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 88, 8641-8645; Bruce, A.G., et al. (1992) *J. Immunol.*, 149, 1271-1275) や、肝細胞の急性期蛋白質誘導作用 (Richards, C.D., et al. (1992) *J. I*

mmunol., 148, 1731-1736; Baumann, H., et al. (1993) *J. Biol. Chem.*, 268, 8414-8417) などのように、LIFと共通の生物学的機能を数多くもっている。しかし、ヒトオンコスタチンMは、内皮細胞の増殖促進作用 (Wijelath, E.S., et al. (1997) *J. Cell Sci.*, 110, 871-879) や平滑筋の増殖促進作用 (Grove, R.I., et al. (1993) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 90, 823-827) などのように、特有の機能ももっている。現在までに、2種類のヒトオンコスタチンM受容体が同定されている。I型オンコスタチンM受容体はLIF受容体と同一で、gp130とLIF結合サブユニットから構成され (Gearing, D.P., et al. (1991) *EMBO J.*, 10, 2839-2848; Gearing, D.P., et al. (1992) *Science*, 255, 1434-1437; Liu, J., et al. (1992) *J. Biol. Chem.*, 267, 16763-16766)、II型受容体はgp130とオンコスタチンM特異的サブユニットから構成される (Mosley, B., et al. (1996) *J. Biol. Chem.*, 271, 32635-32643)。つまり、LIFとオンコスタチンMとの共通の機能はI型受容体を介するものであり、オンコスタチンM特有の活性はII型受容体によって伝達されているのである (Thoma, B., et al. (1994) *J. Biol. Chem.*, 269, 6215-6222; Mosley, B., et al. (1996) *Biol. Chem.*, 271, 32635-32643)。

【0010】一方、マウスのオンコスタチンMは特有の受容体 (II型受容体) しか使用せず、LIF受容体とは反応しない (Ichihara, M., et al. (1997) *Blood*, 90, 165-173; Lindberg, R.A., et al. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3357-3367)。マウスのオンコスタチンMは、造血細胞中でIL-3により誘導される遺伝子としてクローニングされ (Yoshimura, A., et al. (1996) *EMBO J.*, 15, 1055-1063)、骨髓やさまざまな種類の造血細胞で発現していることが示されている (Ichihara, M., et al. (1997) *Blood*, 90, 165-173)。マウスオンコスタチンMが同定されたことによって、マウスの実験系を用いてオンコスタチンM特有の作用を解析することが可能となった。例えば、本発明者らは最近、オンコスタチンMが、E11マウス胚の大動脈-性腺-中腎 (AGM) 領域に備わる推定上の祖先細胞 (血管芽細胞) から完全な造血細胞への分化を促進することを明らかにしている (Mukoyama, Y., et al. (1998) *Immunity*, 8, 105-114; 特願平9-290440)。しかしながら、オンコスタチンMと肝細胞の成熟に関しては、何ら報告はなされていない。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、未成熟肝細胞を成熟肝細胞 (機能的な肝細胞) へ分化させる方法を提供する。より詳しくは、未成熟肝細胞をオンコスタチンMおよびデキサメタゾンと共培養することに、該細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法を提供する。また、本発明は、該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、成熟細胞への分化誘導系を開発するために、まず、マウス胎児肝細胞の新規な初代培養系の確立をし、この系を用いてin vitroで肝発生を促進する分子の探索を行った。種々のサイトカインの初代肝細胞への影響の検討を行ったところ、オンコスタチンMだけが、成熟肝細胞に類似した複数のクラスターの形成を誘導した。また、このようなオンコスタチンMの作用に、生理的濃度のデキサメタゾンの存在が必須であることを見出した。

【0013】そこで、次に、肝臓の重要で特徴的な機能であるアルブミン産生が、オンコスタチンMにより制御されるか否かの検討を行った。その結果、胎児肝細胞に対し、何らのサイトカインを添加せずに培養するとアルブミン産生は1～2週間以内に徐々に減少していくのに対し、オンコスタチンMとデキサメタゾンが共存すると、アルブミン産生が維持され、その作用が相乗的かつ用量依存的であることが判明した。

【0014】次に、本発明者らは、in vitroにおけるオンコスタチンMとデキサメタゾンによる肝分化マーカー遺伝子の誘導に関する検討を行なった。その結果、これら因子の双方を添加して胎児肝細胞の培養を行った場合に、肝成熟の程度をモニターするための有用なマーカーとなるG6PアーゼおよびTATの mRNA発現が誘導されることを見出した。IL-6関連サイトカイン (IL-6、LIF、IL-11) は、これらの遺伝子の発現を誘導しなかったが、IL-6を可溶性IL-6受容体とともに添加すると、両遺伝子の mRNAが相当量誘導された。この事実から、オンコスタチンMは、IL-6と共通の伝達受容体サブユニットであるgp130を介して分化シグナルを伝達していることが示唆された。

【0015】分化した肝臓のもうひとつの重要な機能である血糖値の制御は、糖新生の速度とグリコーゲンの分解速度によってコントロールされている。糖新生は、後期胎児発生の時期に始まり、周産期の肝細胞や分化の進んだ肝細胞は、グリコーゲンを大量に貯蔵している。オンコスタチンMとデキサメタゾンが肝細胞の機能的成熟を誘導し、グリコーゲンを産生貯蔵させるかどうかを調べるため、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色法を用い、in vitroにおける細胞内のグリコーゲン蓄積量を分析した。その結果、2日間インキュベートした胎児肝細胞からは、これら因子の双方またはいずれかを添加したか否かにかかわらず、グリコーゲンの蓄積は検出できなかった。それに対し、6日間インキュベートした場合、オンコスタチンMとデキサメタゾンの両方を添加すると、大多数の細胞でグリコーゲンの蓄積が強く誘導された。この結果から、これら因子が形態変化や分化マーカーを誘導するだけでなく、肝細胞の機能的成熟を誘導することが示された。また、gp130^{-/-}マウスの肝臓におけるグリコーゲン蓄積量を分析した結果、通常の肝細胞は、E17

段階でも新生児段階でもグリコーゲンを大量に蓄積しているのに対して、gp130^{-/-}マウスの肝臓の場合、細胞内グリコーゲンの蓄積量は劇的に減少していた。

【0016】本発明者らは、発生過程にある肝臓組織中に、オンコスタチンM mRNAおよびオンコスタチンM受容体 mRNAが発現しているかを調べた。その結果、E12から新生児段階にある肝臓から、オンコスタチンM mRNAがはっきりと検出された。一方、オンコスタチンM受容体 mRNAの発現は、E14から検出できるようになり、成体肝臓に達しても発現し続けることが明らかになった。続いて、E14胚肝細胞からCD45陽性造血細胞と接着細胞とを分離し、これらの細胞にオンコスタチンM mRNAやオンコスタチンM受容体 mRNAが発現しているかを調べたところ、興味深いことに、オンコスタチンM mRNAはCD45陽性造血細胞に特異的に発現しており、オンコスタチンM受容体 mRNAは、大部分が肝細胞であるCD45陰性の接着細胞で発現していた。この結果から、オンコスタチンMが、近接する肝細胞に作用する造血細胞由来パラクライ因子であると考えられた。さらに、in vitroにおけるオンコスタチンM受容体の発現量はオンコスタチン刺激により増加するため、胎児肝細胞にポジティブフィードバック機構が存在することが示唆された。

【0017】以上のことから、本発明者らにより開発された、オンコスタチンMとデキサメタゾンを利用したマウス胎児肝細胞の分化誘導系が、未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化誘導のモデルとして利用できることが示された。従って、この分化誘導系は、肝細胞の発生にかかわる因子の解明や、肝細胞の成熟を調節する化合物のスクリーニングに利用することが可能である。さらに、肝細胞の成熟を調節する化合物は、肝関連疾患の治療薬や予防薬への応用が期待される。

【0018】これまで機能的な肝細胞を調製する方法は存在していなかったが、この分化誘導系を利用すれば機能的な肝細胞の大量調製が可能である。このため、本発明の分化誘導系は人工心臓の作成のための基盤技術として重要である。また、調製された肝細胞は、ある化合物が該肝細胞により解毒されるか否かなどを調べることに、人体に毒性を有するか否かの検定に用いることも考えられる。

【0019】本発明は、オンコスタチンMおよびデキサメタゾンを利用した未成熟肝細胞を成熟肝細胞 (機能的な肝細胞) へ分化させる方法、および該方法を利用した未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を調節する化合物のスクリーニング方法に関し、より具体的には、(1) オンコスタチンMおよびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養することを特徴とする、未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法、(2) 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎児由来である、(1)記載の方法、(3)

(1)または(2)に記載の方法により調製される成熟肝細胞、(4) 外来遺伝子が挿入されている、

(3)に記載の成熟肝細胞、(5) 未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を抑制または促進する化合物をスクリーニングする方法であって、(a)被検試料、オンコスタチンM、およびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(b)該未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を検出する工程、および(c)被検試料非存在下で該分化を検出した場合(対照)と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程、を含む方法、(6) 未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を、細胞のクラスターの形成、細胞内におけるグリコーゲンの蓄積、細胞内におけるアルブミンの産生、TAT遺伝子の発現、およびG6Pアーゼ遺伝子の発現からなる群より選択される指標により検出する、(5)に記載の方法、(7) 未成熟肝細胞が哺乳動物の胎児由来である、(5)または(6)に記載の方法、(8) (5)から(7)のいずれかに記載の方法により単離しうる、未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を抑制または促進する化合物、に関する。

【0020】

【発明の実施の形態】本発明は、未成熟肝細胞を成熟肝細胞(機能的な肝細胞)へ分化させる方法に関する。本発明の方法は、オンコスタチンMおよびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養することを特徴とする。

【0021】本発明における未成熟肝細胞の培養においては、通常、約 2×10^4 から約 4×10^4 /cm² の細胞を播く。

【0022】胎生肝細胞は強い増殖能を有しているため、培地においては、一般的な培養条件(EMBO J. (1999) in press Kamiya A. et al)よりも高濃度の栄養分を添加すると好ましい。例えば、成熟肝細胞の培養においては、一般に、WE培地が用いられるが、本発明の培養においては、アミノ酸などの含有率の高いDMEMを用い、さらに非必須アミノ酸(特に、プロリン)を添加すると好適である。

【0023】培地には、通常、約10ng/mlから約100ng/mlのオンコスタチンMを添加する。培養が長期間(数日以上)に亘る場合には、培地交換により一定濃度(約10ng/ml以上)のオンコスタチンMを維持することが培養上好ましい。培地には、オンコスタチンMとともに、約 5×10^{-8} から約 5×10^{-7} M、好ましくは約 1×10^{-7} Mのデキサメタゾンを添加する。さらに、約1-10μg/mlのインシュリンを添加することが好ましい。培養は、通常の組織培養条件、例えば、5% CO₂ -20%O₂、37°Cで行うことができる。

【0024】本発明の方法に用いられる未成熟肝細胞としては、増殖が可能であり、オンコスタチンMおよびデキサメタゾンの作用により、成熟肝細胞へ分化しうる細胞であれば制限はない。好適な細胞としては、例えば、増殖力の高い哺乳動物の胎児由来の肝細胞が挙げられる。哺乳動物としては、ヒト、マウス、ウシなどが挙げ

られるが、これに制限されない。ヒトへの応用を考えた場合には、ヒト細胞が好ましい。未成熟肝細胞の調製は、例えば、実施例1に記載の方法に従って行うことができる。

【0025】本発明の成熟細胞への分化誘導系は、未成熟肝細胞から成熟肝細胞への分化を調節する化合物のスクリーニングに利用することができる。即ち、上記成熟肝細胞の分化誘導系において被検試料を添加し、未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化に与える影響を検出することによって、該分化を阻害または促進するような化合物をスクリーニングすることができる。より具体的には、

(a)被検試料、オンコスタチンM、およびデキサメタゾンの存在下で未成熟肝細胞を培養する工程、(b)該未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化を検出する工程、および(c)被検試料非存在下で該分化を検出した場合(対照)と比較して、該分化を抑制または促進する化合物を選択する工程、を含む方法により、このようなスクリーニングを実施することができる。

【0026】スクリーニングに用いる被検試料としては特に制限はなく、例えば、合成低分子化合物のライブラリー、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー、細胞抽出液、細胞培養上清などが挙げられる。

【0027】被検試料を添加した際の未成熟肝細胞の成熟肝細胞への分化は、種々の指標を利用して検出することができる。このような指標としては、例えば、細胞のクラスターの形成、細胞内におけるグリコーゲンの蓄積、細胞内におけるアルブミンの産生、TAT遺伝子の発現、およびG6Pアーゼ遺伝子の発現などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0028】この検出の結果、被検試料の添加により、被検試料非存在下で該分化を検出した場合(対照)と比較して該分化が抑制されていれば、用いた被検試料は、成熟細胞への分化を抑制する化合物である(または、該化合物を含む)と判定され、一方、対照と比較して該分化が促進されていれば、用いた被検試料は、成熟細胞への分化を促進する化合物である(または、該化合物を含む)と判定される。

【0029】現在、成熟肝細胞の培養は、短期間のみ可能である。また、一般に肝細胞は増殖能が強く継代培養が可能であるが、肝機能を失っている。即ち、機能的な肝細胞を調製する方法は、これまで存在していなかった。本発明の分化誘導系は、増殖能を持つ胎児肝細胞を用いることで肝細胞の増幅を行うことができ、オンコスタチンM処理により簡便に機能的肝細胞への分化を誘導することができる。本発明の分化誘導系は、機能的肝細胞を調製するための初めての方法である。

【0030】この分化誘導系を用いて単離される化合物は、機能的肝細胞を大量調製する際の、肝細胞の増殖や分化を制御するために有用であり、また、肝関連疾患の

予防薬や治療薬の開発の上でも有用である。

【0031】また、本発明の分化誘導系を用いて得られた機能的肝細胞は、マイクロキャリアなどの支持体に付着させ、ハイブリッド型人工肝臓を作成する上で有用である。人工肝臓の場合には、必ずしもヒト由来の肝細胞を使用する必要はないが、ヒト胎児肝からの肝細胞培養により得られた細胞は、患者に移植することで肝疾患治療に応用することが可能である。また、この技術は、遺伝子治療への応用も可能である。

【0032】

【実施例】以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0033】〔実施例1〕 オンコスタチンM刺激による初代培養胎児肝細胞の形態変化
C57BL/6Cr Slcマウス（日本SLC、日本）を実験に使用した。ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、牛胎児血清、肝灌流培地、肝消化培地、MEM非必須アミノ酸溶液、インシュリン・トランスフェリン・セレンX（ITS）は、Gibco-BRLから購入した。ネズミEGFはChemicon International（アメリカ）から購入した。ヒトIL-6、ヒトIL-11、マウスLIF、ヒトTGF- β は、味の素社およびキリンビール社（日本）のものを用いた。マウスオンコスタチンMはR&D Systems社のものを用いた。抗マウスアルブミン抗体は、Nordic Immunological Laboratories社（オランダ）のものを用いた。

【0034】まずE14胚由来マウス胎児肝細胞の新規な初代培養系を確立した。C57BL/6Cr Slcマウス（E14）の胚肝臓組織を細かく刻み、酵素を含む分散緩衝液（肝消化培地）に分散させた後、低張緩衝液で溶血させた。分散細胞を、DMEMに10%牛胎児血清、2mM L-グルタミン、1x非必須アミノ酸溶液、1xITS、50 μ g/mlゲンタマイシン、 10^{-7} デキサメタゾンを加えた培地に懸濁し、0.1%のゼラチンでコートした組織培養皿にプレーティングした。数時間後、培地で何回も洗浄して、混入している造血細胞や細胞破片を除去した。培地は、2日ごとに交換した。残存する接着細胞は、単層のシートとなった。これらの細胞の大部分は、上皮細胞の形態をとり、誘導するとアルブミンを発現する能力をもっているため、肝細胞であると考えられた。培養した肝細胞は自律的に増殖し、G6PやTATのような分化マーカーを発現しておらず、この段階ではin vivoにおける胎児肝細胞の特徴をもっていた。培養した胎児肝細胞は、4%パラホルムアルデヒドで固定し、抗アルブミン抗体とともにインキュベートした。その後、試料を西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）を結合させた抗ウサギIgG（Amersham）とインキュベートした。ペルオキシダーゼ活性は、0.025%ジアミノベンチジン、0.08% NiCl₂、0.5% 過酸化水素を含むPBS溶液中で検出し、0.01% Tween20を含むPBS溶液で洗浄することにより反応を停止させ

た。

【0035】この系を用いて、in vitroで肝発生を促進する分子の探索を行った。その結果、オンコスタチンMを添加すると、成熟肝細胞に類似した複数のクラスターが形成された。これらのクラスターは、細胞間接着が強く、密度が高く、顆粒を含む細胞質、明確な丸い核をもっており、成熟肝細胞のように細胞間オルガネラが充分分化していることを示している。そしてこのようなオンコスタチンMの作用には、生理的濃度のグルココルチコイド（ 10^{-7} のデキサメタゾン）の存在が必須であることを見出した。培養細胞中に形成されるクラスター数はオンコスタチンM濃度とデキサメタゾン濃度に依存し、このことはオンコスタチンMとグルココルチコイドが胎児肝細胞の形態変化を相乗的に誘導することを示している。このようなクラスター形成はEGF、TGF- β 、IL-6、IL-11、LIFで刺激した培養細胞では見られず、オンコスタチンMに特有な効果であると考えられた。

【0036】〔実施例2〕 オンコスタチンMとデキサメタゾンによるアルブミン産生制御

E14日胚の肝臓は、成体肝細胞と比べるとかなり低いレベルであるが、検出できる程度の量のアルブミンを発現している。アルブミン産生は肝臓の重要で特徴的な機能であるため、オンコスタチンMが培養肝細胞のアルブミン産生を制御するかどうかを調べた。

【0037】サイトカイン存在下あるいは非存在下で6日間インキュベートした後、等量の総細胞蛋白質についてウェスタンブロット分析を行い、アルブミン産生を調べた。ウェスタンブロットによるアルブミン産生の解析は以下のようにして行った。すなわち、サイトカインで刺激した細胞あるいは無刺激の細胞の界面活性剤溶解物を、細胞をNP-40溶解緩衝液（150mM 塩化ナトリウム、1.0% NP-40、50mM Tris-HCl（pH8.0）、1mM フェニルメチルスルフォニルクロライド、1 μ g/ml ロイペプチン、1mM バナジン酸ナトリウム、1mM EDTA）で溶解させて、調製した。各試料の可溶性画分を還元条件下でSDS-PAGEで分離した後、Immobilon膜（Millipore）に転写した。ブロットされた蛋白アルブミンは、3% BSAを含むTBSに希釈した1 μ g/ml抗マウスアルブミン抗体と反応させた後、HRPを結合させた抗ウサギIgGと反応させた。免疫的に反応するバンドをECL（Amersham）システムで発光させ、それをBio-Maxフィルム（Kodak）上に露光させた。

【0038】その結果、既に報告されているように（Sanchez, A., et al. (1995) J. Cell Physiol., 165, 398-405）、胎児肝細胞を因子を何も加えずに培養すると、アルブミン産生は1～2週間以内に徐々に減少した（図1）。一方、オンコスタチンMとデキサメタゾンが共存すると、アルブミン産生は維持され、その作用は相乗的かつ用量依存的であった（図2）。TGF- β は、E21ラット胚由来の培養肝細胞のアルブミン量を維持させること

が報告されている (Sanchez, A., et al. (1995) J. Cell Physiol., 165, 398-405)。しかしE14マウス胚由来肝細胞を用いた本発明者らの系では、そのような効果はみられなかった。これは、E14胚由来肝細胞はより未成熟であるため、TGF- β 刺激に対する感受性がないためと考えられた。

【0039】[実施例3] in vitroにおけるオンコスタチンMとデキサメタゾンによる肝分化マーカー遺伝子の誘導

肝発生の過程の中で、肝臓特異的遺伝子の発現は、それぞれの段階ごとに必要とされる肝臓の機能に従って、厳密に制御されている (Panduro, A., et al. (1987) Genes Dev., 1, 1172-1182)。肝臓は、出生直後に代謝機能を有している必要があるため、周産期前後に遺伝子発現の劇的な変化が起こる。例えば、ラットでは、G6PaseはE20~21 (出生直前) に産生され始め、その発現量は出生から1時間後に最大に達する。同様に、TAT mRNAは出生後に初めて出現するようになり、成熟にしたがって増加していく。このようなG6PaseやTATのmRNA発現様式は、マウス肝発生においても観察された (図3、4)。したがって、これらの遺伝子は、マウスにおいても、肝成熟の程度をモニターするための有用なマーカーとなる。

【0040】オンコスタチンMとデキサメタゾンによって、G6Pase (および/または) TATのmRNA発現が誘導できるかどうかを調べるため、胎児肝培養細胞をオンコスタチンMやTGF- β で刺激した。デキサメタゾンが存在しないと、オンコスタチンMを加えても、どちらのmRNAも検出されなかった。デキサメタゾンだけで刺激すると、G6Pase mRNAだけが4日目から6日目にかけてわずかに誘導され、その後急速に消失した。一方、オンコスタチンMとデキサメタゾンとを加えて培養した肝細胞では、刺激後4日目からG6Pase mRNAが発現し始めた。その後その発現量は増加し続け、8~10日後に最大値に達した (図5)。TAT mRNA発現の誘導は、もっと顕著であった。オンコスタチンMは、4日目からTAT mRNA発現を誘導し、8日目に最大値が得られた。オンコスタチンMが存在しないとTAT mRNAはほとんど検出できないため、in vitroにおけるTAT誘導はオンコスタチンMに強く依存していることがわかる。一方、急性期蛋白質 (ハプトグロビン) のmRNAは、オンコスタチンMによって、G6PaseやTATのmRNAよりも早く誘導された (図6)。これらの結果は、分化マーカーの誘導と急性期蛋白質の誘導 (Richards, C.D., et al. (1992) J. Immunol., 148, 1731-1736; Richards, C.D., et al. (1997) J. Immunol., 159, 2431-2437) は、少なくとも部分的には異なる分子機構で進行することを示唆している。他のIL-6関連サイトカイン (IL-6、LIF、IL-11) は、これらの酵素誘導を刺激しなかった。しかし、IL-6を可溶性IL-6受容体 (Yasukawa, K., et al. (1992) Immunol. Lett., 31, 123-130; Yawata, H., et

al. (1993) EMBO J., 12, 1705-1712) とともに添加すると、両酵素のmRNAが相当量誘導された (図7)。このことは、IL-6刺激に対する応答が見られないのはIL-6R α が発現していないためであり、オンコスタチンMは、共通の伝達受容体サブユニットであるgp130を介して分化シグナルを伝達していることを示唆している。

【0041】なお、ノーザンブロットによるmRNA発現分析は以下のように行った。すなわち、細胞あるいは組織mRNA試料を、AGPC法 (Chomczynski, P., et al. (1987) Anal. Biochem., 162, 156-159) により精製した。各10 μ gの全RNAを、2%ホルムアルデヒドを含む1.5%アガロースゲルで分離し、プラスに荷電したナイロン膜 (Boehringer Mannheim) に転写した。膜にUVを照射した後、高SDS緩衝液 (7% SDS、50%ホルムアミド、5xSSC、2%ブロッキング剤 (Boehringer Mannheim)、50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0)、0.1% N-ラウロイルサルコシン) 中で、rTaqDNAポリメラーゼ反応により作製したジギキシゲニン (DIG) 標識cDNAプローブとハイブリダイズさせた。その後、膜をアルカリホスファターゼ標識した抗DIG抗体 (Boehringer Mannheim) 処理し、説明書に従ってCDP-star (New England Biolab.) で検出した。

【0042】[実施例4] 分化マーカーの誘導には、オンコスタチンMが常時存在していることが必要であることを示す実験

肝成熟のどの時期にオンコスタチンMが必要であるのかを調べるため、胎児肝細胞のin vitro成熟系からオンコスタチンMを除去したり、オンコスタチンMの添加時期を遅くしたりしてみた。オンコスタチンM/デキサメタゾンによって一度刺激を受けた肝細胞から、さまざまな時期に、オンコスタチンMを除去した。刺激後7日目に、分化マーカーの発現量を分析した。その結果、5日目までにオンコスタチンMを除去すると、分化マーカーの誘導が減少した。それに対し、5日目にオンコスタチンMを除去すると、継続的にオンコスタチンM刺激したときに比べると誘導量はやや少ないが、分化マーカーの発現が誘導された。逆に、オンコスタチンMの添加時期を遅くすると、分化マーカーの発現が減少した。オンコスタチンMの添加時期を遅くするほど、mRNA発現量が低くなった。すなわち、in vitroにおける肝成熟の誘導には、継続的なオンコスタチンM刺激が必要であると考えられた。

【0043】[実施例5] オンコスタチンMとデキサメタゾンによるin vitro糖新生刺激

血糖値の制御は、分化した肝臓のもうひとつの重要な機能であり、糖新生の速度とグリコーゲンの分解速度によってコントロールされている (Nemeth, A.M., et al. (1954) J. Biol. Chem., 208, 765-776; Foster, D.O., et al. (1966) Biochemistry, 5, 555-562)。糖新生は、後期胎児発生の時期に始まり、周産期の肝細胞や分化の進

んだ肝細胞は、グリコーゲンを大量に貯蔵している (Yeung, D., et al. (1967) *Biochem. J.*, 103, 744-74; Philipidis, H., et al. (1969) *Biochem. J.*, 113, 651-657)。オンコスタチンM/デキサメタゾンが肝細胞の機能的成熟を誘導し、グリコーゲンを産生貯蔵させるかどうかを調べるため、過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色法を用い、*in vitro*における細胞内のグリコーゲン蓄積量を分析した。オンコスタチンMの存在下で2日間あるいは6日間培養した胎児肝細胞を、PAS試薬で染色した。

【0044】PAS染色は次のようにおこなった。すなわち、さまざまな条件で培養した胎児肝細胞やパラフィンに埋め込まれた肝組織切片を20%ホルムアルデヒドで固定し、標準法に従って (Nettleton, G.S., et al. (1977) *Stain Technol.*, 52, 63-77) PAS染色溶液 (Muto Pure Chem. 日本) で細胞内のグリコーゲンを染色した。

【0045】その結果、2日間インキュベートした細胞からは、オンコスタチンMおよび/またはデキサメタゾンを添加したか否かにかかわらず、グリコーゲンの蓄積は検出できなかった。それに対し、6日間インキュベートした場合、デキサメタゾンだけを添加した肝細胞の一部にグリコーゲンの蓄積がわずかにみられ、オンコスタチンMとデキサメタゾンとを両方添加すると、大多数の細胞でグリコーゲンの蓄積が強く誘導された。一方、6日間インキュベートした場合でも、オンコスタチンMだけしか添加しなかったとき、あるいは両因子とも添加しなかったときは、グリコーゲンの大量蓄積は見られなかった。これらの結果は、オンコスタチンM/デキサメタゾンが形態変化や分化マーカーを誘導するだけでなく、肝細胞の機能的成熟を誘導することを示している。

【0046】〔実施例6〕 gp130ノックアウトマウス肝臓の発生欠陥

*in vivo*におけるオンコスタチンMとオンコスタチンM受容体 (OSMR) の役割さらに調べるため、gp130^{-/-}マウス (Yoshida, K., et al. (1996) *Proc. Natl Acad. Sci. U S A*, 93, 407-411) を用いて分析を行った。元来gp130欠損のC57BL/6マウスはE14前後で死んでしまうが、遺伝的にICRの系統に属するgp130^{-/-}マウスは少し長く生き延びることが多く、出生直後に死亡する (Kawasaki, K., et al. (1997) *Endocrinology*, 138, 4959-4965)。これゆえ、このマウスを、後期胎児肝発生の解析に用いることができる。gp130^{-/-}マウスの肝臓機能を調べるため、肝臓へのグリコーゲン蓄積量をPAS染色法を用いて分析した。通常の肝細胞は、E17段階でも新生児段階でも、グリコーゲンを大量に蓄積している。それに対して、gp130^{-/-}マウスの肝臓の場合、肝小葉の末梢にPAS染色性細胞が多少みられたが、細胞内グリコーゲンの蓄積量は劇的に減少していた。gp130^{-/-}マウスの肝臓にグリコーゲンの蓄積があまり起こらないという現象は、胎児の肝細胞をデキサメタゾンだけを添加して*in vitro*で培養するとPAS染色性の細胞数が少ないという現象と共

通している。このことは、グルコシルコイドはグリコーゲン蓄積を制限するように誘導してはいるが、完全な代謝機能発現のためにはオンコスタチンM-gp130シグナル経路が必要であることを示唆している。gp130^{-/-}マウスに見られる欠陥は、C/EBP α -ノックアウトマウスの欠陥を思い起こさせる (Wang, N.D., et al. (1995) *Science*, 269, 1108-1112)。C/EBP α -マウスの肝細胞では、分化マーカーに対する効果は比較的低いにもかかわらず、PAS染色は陰性である。同様に、gp130^{-/-}マウス由来の肝臓では、TAT発現が多少減少している (図8)。したがって、これらの遺伝子の発現は、グルコシルコイドや未知因子により部分的に誘導可能であるが、十分な機能をもつ肝臓の発生のためには、gp130シグナル伝達経路およびC/EBP α シグナル伝達経路の両方が必要であると考えられた。

【0047】〔実施例7〕 発生中の肝臓におけるオンコスタチンM mRNAおよびオンコスタチンM受容体 mRNAの発現

分化マーカーの誘導、形態的成熟、機能的成熟がオンコスタチンM/デキサメタゾンにより特異的に引き起こされる事実は、これらの分子が、*in vivo*における肝発生に関与していることを示唆している。グルコシルコイドは血液循環によって供給されと考えられるが、サイトカイン様のオンコスタチンMは作用部位において局所的に産生されることが多い。したがって、もしオンコスタチンM/オンコスタチンM受容体系が実際に*in vitro*成熟過程に関与しているならば、オンコスタチンMとオンコスタチンM受容体は発生中の肝臓に共存していると考えられる。そこで、発生過程にある肝臓組織中に、オンコスタチンM mRNAおよびオンコスタチンM受容体 mRNAが発現しているかを調べた。

【0048】RT-PCRによる mRNA検出に用いたオンコスタチンM、TAT、G6Pアーゼに対するPCRプライマーは、既報 (Yoshimura et al. *EMBO J.* 15;1055-1063 (1996)、Grange T. et al. *J. Mol. Biol.* 184;347-350 (1985)、Shelly L. et al. *J. Biol. Chem.* 268;21482-21485 (1993)) の配列情報に基づいて合成した。マウスオンコスタチンM受容体に対するプライマーは、本発明者らが最近決定したcDNAクローンの配列 (Tanaka et al. *Blood* 93;804-815 (1999)) に基づいて合成した。CD45陽性細胞は、抗マウスCD45抗体 (PharMingen)、ダイナビーズM-450、抗ラットIgG (DynaL A. S. ノルウェー) を用いて、E14杯肝細胞の懸濁液から分離した。ファーストストランドcDNAは、First-Strand cDNA Synthesis Kitを用い、CD45陽性細胞や接着性肝細胞から合成した。合成したcDNAは、ネズミのオンコスタチンMやオンコスタチンM受容体のPCR増幅のための鋳型として用いた。プライマーのアニーリングは50℃で60秒間、増幅は35サイクル行った。増幅した産物を1.5%アガロースゲルで分離し、臭化エチジウムを用いて染色した。

【0049】その結果、E12から新生児段階にある肝臓から、オンコスタチンM mRNAがはっきりと検出された。一方、オンコスタチンM受容体 mRNAの発現は、E14から検出できるようになり、成体肝臓に達しても発現し続けることが明らかになった(図9)。続いて、E14胚肝細胞からCD45陽性造血細胞と接着細胞とを分離し、これらの細胞にオンコスタチンM mRNAやオンコスタチンM受容体 mRNAが発現しているかを調べた。興味深いことに、オンコスタチンM mRNAはCD45陽性造血細胞に特異的に発現しており、オンコスタチンM受容体 mRNAは、大部分が肝細胞であるCD45陰性の接着細胞で発現していた(図10)。これゆえ、オンコスタチンMは、近接する肝細胞に作用する造血細胞由来パラクライン因子であると考えられる。さらに、in vitroにおけるオンコスタチンM受容体の発現量はオンコスタチンM刺激により増加するため、胎児肝細胞にポジティブフィードバック機構が存在することが示唆された(図11)。

【0050】【実施例8】 オンコスタチンM刺激した胎児肝細胞の解毒系機能
オンコスタチンM刺激した胎児肝細胞が成熟肝細胞の特性を有するか否かのさらなる解析のために、オンコスタチンM刺激した胎児肝細胞の解毒系機能の検討を行った。解毒系機能の一つとして、培地中のNH₃の除去能の検討を行った。その結果、オンコスタチンMに依存して、細胞内へのNH₃の取り込みが増加することが判明した。これに相関して、尿素回路系の酵素であるCPSの発現がオンコスタチンMにより誘導された。アルブミン分泌能、脂質合成能についても同様の解析を行ったところ、いずれの機能もオンコスタチンM依存的に亢進された。

【0051】

【発明の効果】本発明により、未成熟肝細胞を成熟肝細胞へ分化させる方法が提供された。本発明の方法によれば、オンコスタチンMおよびデキサメタゾンの添加により簡便かつ大量に機能的な肝細胞を調製することができ

る。本発明の分化誘導系は、肝関連疾患の医薬品候補化合物のスクリーニングにおいて有用である。また、本発明の分化誘導系により得られた成熟肝細胞は、人工肝臓への応用が期待される。

【図面の簡単な説明】

【図1】初代培養胎児肝細胞にオンコスタチンM、TGF-β、デキサメタゾンをさまざまに組み合わせて添加したときの、アルブミン発現量の経時変化を示す図である。

【図2】オンコスタチンMまたはデキサメタゾンによる用量依存的なアルブミン生産量の変化を示す図である。

【図3】in vivoにおける、発生段階ごとの肝特異的分化マーカーの発現パターンの変化を示す図である。

【図4】in vitroにおける、オンコスタチンMとデキサメタゾンによる肝分化マーカーmRNAの誘導を示す図である。

【図5】オンコスタチンM刺激後の、G6Pアーゼ mRNAとTAT mRNAの経時変化を示す図である。

【図6】オンコスタチンM刺激後の、ハプトグロビン mRNA誘導の経時変化を示す図である。

【図7】他のIL-6関連サイトカインを用いて刺激した場合には、G6Pアーゼ mRNAやTAT mRNA発現は誘導されないことを示す図である。

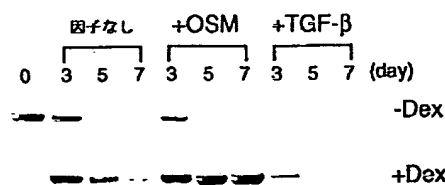
【図8】gp130ノックアウトマウス由来肝臓の成熟欠陥を示した図である。

【図9】RT-PCR分析を用いてin vivoにおけるオンコスタチンMとオンコスタチンM受容体の発現を示した図である。

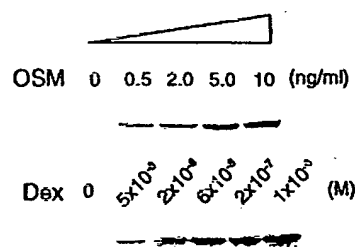
【図10】E14胚肝臓のうち、CD45陽性造血細胞および造血細胞を除去した肝細胞からメッセンジャーRNAサンプルを調製し、RT-PCR分析を行ってそれぞれのオンコスタチンM mRNAとオンコスタチンM受容体 mRNA量を示した図である。

【図11】in vitroにおけるオンコスタチンMによるオンコスタチンM受容体 mRNAの誘導を示した図である。

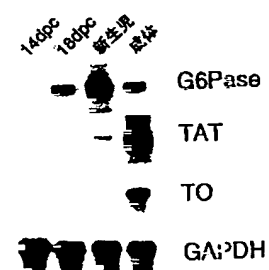
【図1】

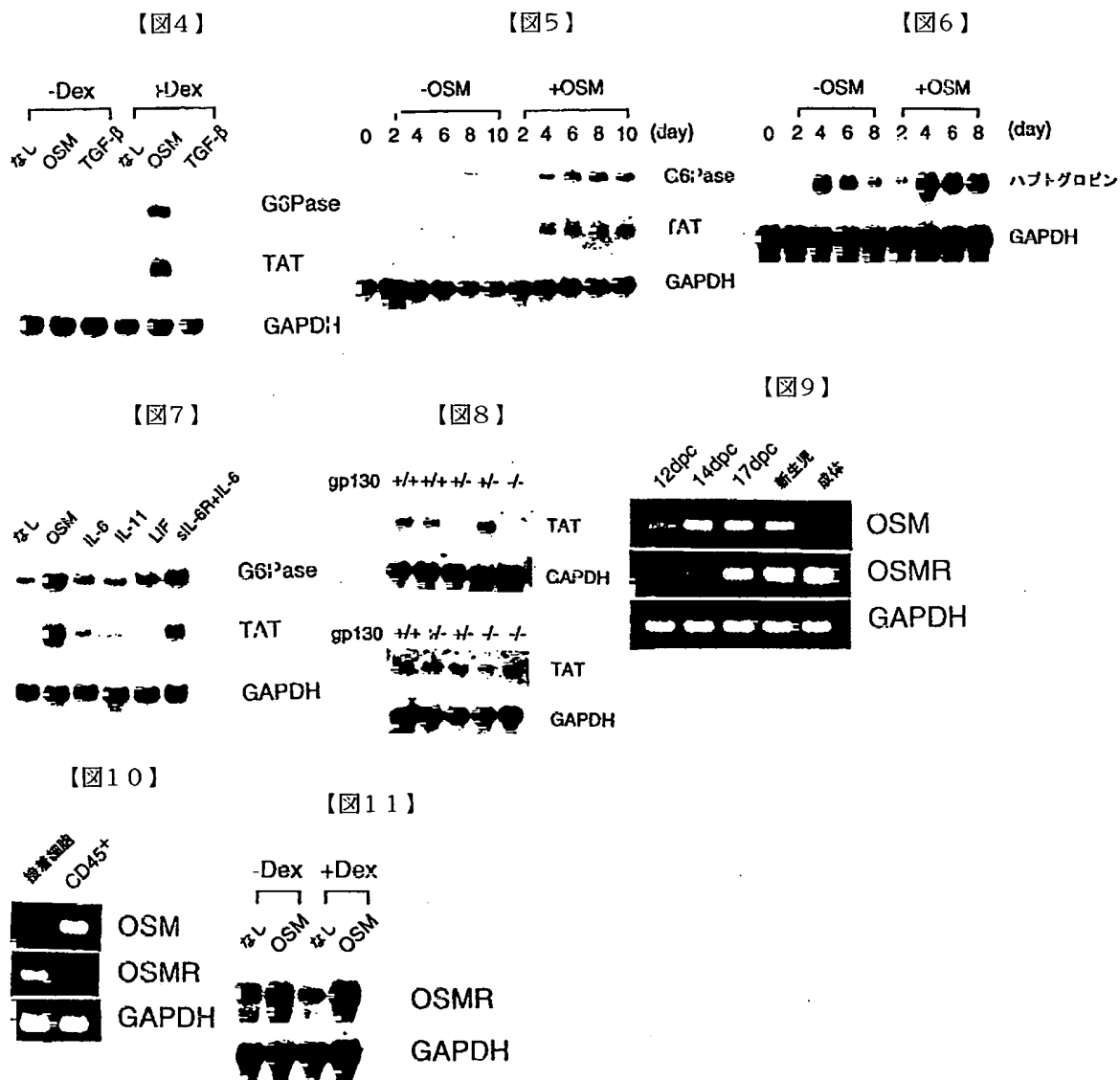


【図2】



【図3】





フロントページの続き

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 CA01 CA11 DA02
 FA01 FA10 HA12
 4B063 QA01 QQ08 QQ42 QQ52 QR77
 QS32
 4B065 AA91X AA93X BB19 BB34
 CA44 CA46